

THESIS

MUNICH

1965

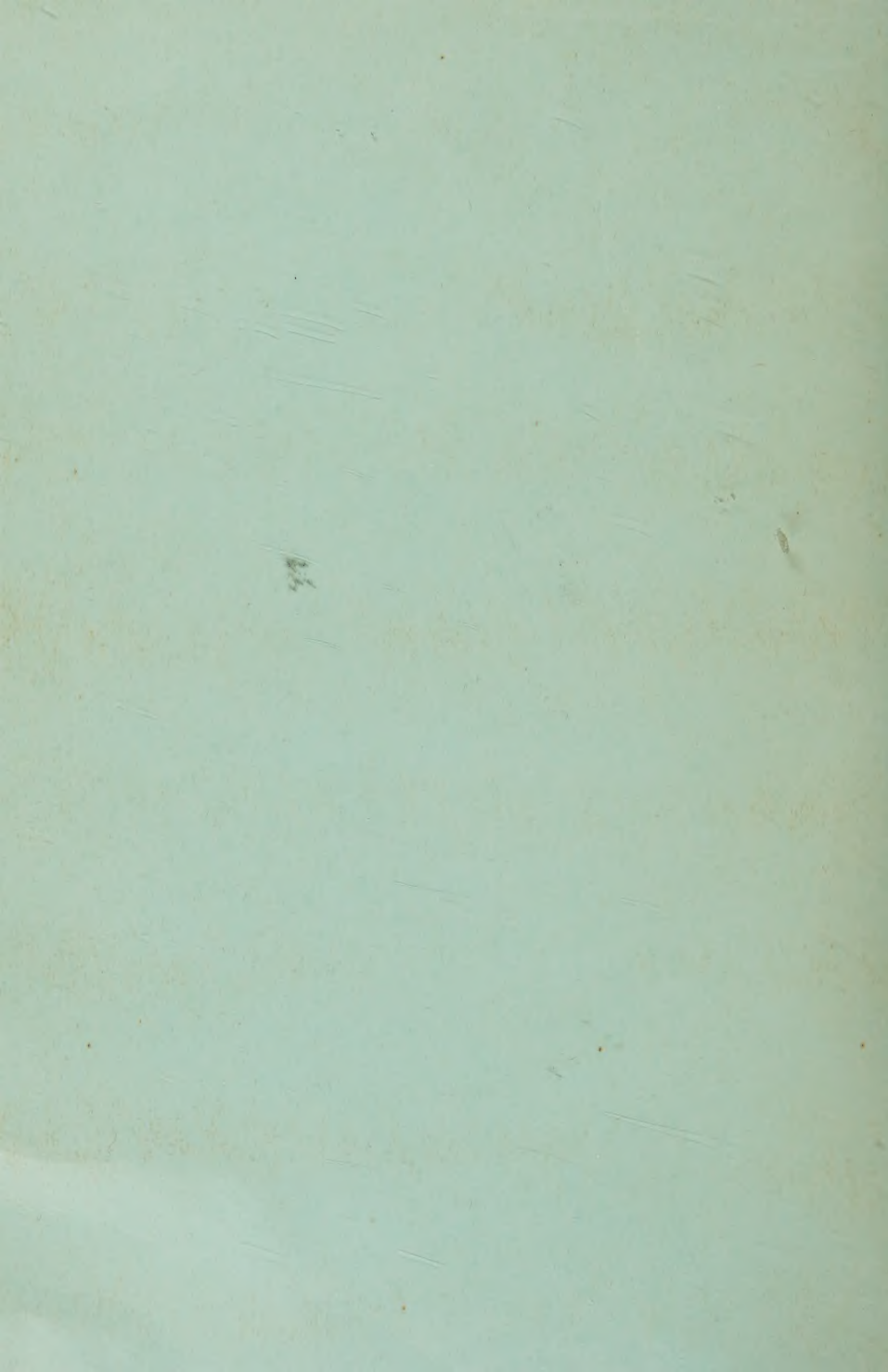
Über den Einfluß
mehrzeitiger Adrenalin-Applikationen
auf das Hyaluronidase-Spreading
bei intakten und adrenaletomierten Ratten

von

EVANGELOS APOSTOLOPOULOS

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Aus der Medizinischen Poliklinik der
Universität München
Direktor: Professor Dr.W.Seitz

Über den Einfluß mehrzeitiger
Adrenalin-Applikationen auf das
Hyaluronidase-Spreading
bei intakten und adrenaletomierten Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen
Fakultät zu München

vorgelegt von
Evangelos Apostolopoulos
aus
Mykonos/Griechenland
1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 1965

Inhaltsverzeichnis

Problematik	5
Eigene Versuche	9
Methodik	9
Versuchsreihen	10
Statistische Auswertung	12
Diskussion	23
Zusammenfassung	26
Literaturverzeichnis	27



Problematik

In früheren Untersuchungen haben M a t h i e s und Mitarbeiter ¹⁻⁸ den Wirkungsmechanismus hyaluronidase-hemmender Substanzen am Beispiel verschiedener Antirheumata aufzuklären versucht. Zunächst wurde mit der gleichen Methodik, wie sie in der vorgelegten Dissertation angewandt wurde, der hyaluronidasehemmende Effekt der Salicylate ¹⁻², verschiedener Pyrazolonderivate ³⁻⁵ und im Moor wirksamer Substanzen ⁶⁻⁷ bestätigt bzw. nachgewiesen.

Es zeigte sich in weiteren Versuchsreihen ^{3, 6, 9, 10}, daß diese hemmende Wirkung auf das durch Hyaluronidase gesteigerte Farbstoffspreading nach Adrenalektomie ausbleibt, womit die Anwesenheit der Nebennieren für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung deutlich wurde. Damit war noch nicht entschieden, ob die Nebennierenrinde oder das Nebennierenmark den hierbei entscheidenden Anteil darstellt. In Erweiterung bereits vorliegender Untersuchungsergebnisse von D o m e n j o z ¹¹ wurde der Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren nach Gabe der genannten Stoffe untersucht ¹⁰. Es zeigte sich, daß hierbei der Ascorbinsäuregehalt signifikant absank, was nach S a y e r s und S a y e r s ¹² im Sinne einer Rindenaktivierung zu deuten ist. Nach Hypophysektomie blieb diese Nebennierenrindenaktivierung aus ^{10, 11}, obwohl gleichzeitig der hyaluronidasehemmende Effekt nicht beeinträchtigt ^{3, 6, 9} wurde. Somit war anzunehmen, daß die untersuchten Substanzen zwar die Nebennierenrinde aktivieren, daß andererseits aber diese Wirkung für das Zustandekommen der Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität nicht entscheidend ist. Da jedoch die Anwesenheit der Nebennieren eine Voraussetzung für eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität darstellt, war zu vermuten, daß

dem Nebennierenmark die ausschlaggebende Bedeutung zukommt.

In Verfolgung dieser Annahme wurden die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin intakten und adrenaletomierten Ratten verabfolgt, wobei in beiden Fällen eine Hyaluronidasehemmung deutlich wurde ^{1,2,13,14}. Dieser Effekt war durch zeitgerechte Applikation eines Adrenolyticums aufzuheben ². Ebenso wurde der durch Salicylate, Phenylbutazon und andere hyaluronidasehemmende Substanzen bedingte hemmende Einfluß auf das Hyaluronidase-Spreading nach vorheriger Ergotamin-Applikation nicht beobachtet.

Ganglienblocker waren in der Lage, den hyaluronidasehemmenden Effekt entsprechend wirksamer Substanzen, nicht jedoch den des Adrenalin und Noradrenalins zu blockieren ¹⁵. Diese Untersuchungsergebnisse sprechen für eine über das Nebennierenmark laufende Wirkung der untersuchten Antirheumatica hinsichtlich ihres hyaluronidasehemmenden Effektes. Es wurde beobachtet, daß das Maximum der Hyaluronidasehemmung nach Adrenalin in verschiedenen Versuchsreihen erst zu einem Zeitpunkt auftrat, zu dem der an der Pupillenweite gemessene pharmakologische Katecholamineffekt bereits sicher abgeklungen war ¹⁴.

Es war demnach anzunehmen, daß kein direkter Adrenalin-effekt bezüglich der Auslösung der Hyaluronidasehemmung vorliegt. Untersuchungen mit Adrenalin-Dauerinfusionen bei adrenaletomierten Ratten ergaben, daß während einer zweistündigen laufenden Adrenalin-Applikation keine Hyaluronidasehemmung eintritt, daß diese vielmehr erst in bestimmtem Intervall nach Absetzen der Infusion meßbar wird ¹⁶.

Gibt man während der Dauerinfusion zusätzliche Adrenalininjektion, so tritt nach dieser bereits während der Dauerinfusion eine Hyaluronidasehemmung auf ¹⁶.

Aus diesen Versuchsergebnissen wurde geschlossen, daß das Absinken des Katecholaminblutspiegels nach vorherigem Anstieg auf ein niedrigeres Niveau die Hyaluronidasehemmung auslöst. Hierbei schienen bereits geringe Blutspiegeldifferenzen von 1 Gamma Adrenalin/100 g Tier und darunter wirksam zu werden ¹⁷. Bestimmungen des Katecholamingehaltes der Nebennieren nach Gabe hyaluronidasehemmender Substanzen zeigten, daß dieser bis zu 6 Gamma und mehr abnimmt, somit zumindestens die gleiche Menge ins Blut freigesetzt werden dürfte und die erforderliche Niveau-Differenz sicher erreicht wird ^{3, 18, 19}. Bei intakten Tieren wurde bereits während einer Adrenalin-Dauerinfusion eine Hyaluronidasehemmung festgestellt, die auf zusätzliche Adrenalin-Freisetzung aus dem Nebennierenmark zurückgeführt wurde ¹⁶. Gleichlautende Versuchsergebnisse teilte ²⁰ M a l o r n y mit, der unter Adrenalininfusionen bei Katzen rhythmisch zusätzliche Blutdrucksteigerungen fand.

Die bisher genannten Untersuchungen über die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins wurden mit intravenöser Applikation durchgeführt, wobei außer den Dauerinfusions-Versuchen unter besonderer Fragestellung einzeitige Adrenalin-Applikationen angewandt wurden. V o g e l , U e b e l und M a r e k ²¹ führten Untersuchungen mit gleicher Fragestellung durch, in denen jedoch eine weitgehend abweichende Methodik angewandt wurde. Zur Objektivierung der Adrenalin-Wirkung wurde Adrenalin in viertelstündigen Abständen gegeben. Die Applikation erfolgte subkutan. Außerdem wurde die Methodik des Hyaluronidase-Pfotenödems der Ratte der Untersuchung zugrundegelegt, die keine Erfassung der zu jedem beliebigem Zeitpunkt innerhalb des Versuches vorliegenden Situation gestattet. Mit dieser Methodik erscheint z. B. die Objektivierung eines zu einem späteren Zeitpunkt auftretenden blockierenden Effektes einer

Hyaluronidasehemmung äußerst problematisch. Außerdem war die Frage, ob man sich mit der gewählten Applikationsform nicht weitgehend den Verhältnissen nähert, wie sie bei den obengeschilderten Adrenalin-Dauerinfusionen¹⁶ vorliegen. Möglicherweise wird unter subkutaner Applikation und wegen der dadurch bedingten Resorptionszeit bei wiederholter Adrenalin-Applikation der Katecholamin-Blutspiegel über einen längeren Zeitraum so gleichmäßig erhöht, daß die zur Auslösung einer Hyaluronidasehemmung notwendige Niveaudifferenz nicht auftritt. Ein solches Verhalten würde besonders bei adrenalektomierten Tieren zu falschen Ergebnissen führen. Allerdings haben Vogel²¹ und Mitarbeiter bei der von ihnen angewandten Methodik des Hyaluronidase-Ödems auch bei adrenalektomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung beobachtet. Es war in der vorgelegten Arbeit mit der geeigneteren Versuchsanordnung des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreadings zu überprüfen, wie sich der Einfluß viertelstündiger Adrenalin-Applikationen auf die Hyaluronidase-Aktivität bei subkutaner Gabe verhält.

Vor allem sollte untersucht werden, ob auch bei adrenalektomierten Tieren eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität bei gleichem Applikationsmodus auftritt, womit beziehendenfalls angenommen werden könnte, daß der Katecholamin-Blutspiegel keine Nivellierung erfährt und genügende Niveaudifferenzen auftreten, die eine Hyaluronidasehemmung während der Versuchszeit garantieren.

Eigene Untersuchungen

1. Methodik

Es wurden für die Versuche männliche weiße Ratten von 190 bis 210 g Gewicht verwendet. Die Versuche erfolgten in Evipan-Narkose. Das Tier wurde in Rückenlage auf einem Brett an den Extremitäten befestigt und die Bauchhaut enthaart, so daß ein Versuchsfeld entstand, das in sechs Felder aufgeteilt wurde. Damit keine Versuchsfehler im Bezug auf die Lokalisation entstehen, wurde das "lateinische Quadrat" verwendet, wobei in jedem Versuch jede Lokalisationsmöglichkeit der Quaddeln zu den betreffenden Versuchszeiten nur einmal angewandt wurde. Es waren daher für eine Versuchsreihe sechs Ratten notwendig. Auf diese Weise wurden streng intracutan sechs Quaddeln pro Ratte gesetzt, wobei zwei Quaddeltypen verwendet wurden: a) die Farbstoffquaddel (F), die 0,1 ccm einer 0,06%igen Evansblue-Lösung enthielt und b) die Farbstoff+ Hyaluronidase-Quaddel (FH), die noch 7,5 IE einer gereinigten Testes-Hyaluronidase gelöst enthielt und naturgemäß eine schnellere und damit eine größere Ausbreitung zeigt.

Am gleichen Tier wurde je ein Kontroll-Quaddelpaar vor der Adrenalin-Applikation gesetzt. Nach zehn Minuten wurde die Begrenzung der Farbstoff-Flecken auf einen Zelluloidstreifen übertragen und anschließend durch Planimetrie der Flächeninhalt in mm^2 berechnet. Danach wurden viertelstündlich 2 Gamma Adrenalin pro 100 g Tier subkutan appliziert und zu festgelegten Versuchszeiten je zwei Quaddelpaare gesetzt.

Für diese Versuche wurden intakte wie auch adrenaletomierte Tiere verwendet. Die Nebennierenextirpation wurde in Äther-Narkose 48 Stunden vor dem Versuch durchgeführt. Links und rechts neben dem musculus erector

trunci, im Winkel zwischen der letzten Rippe und den ersten Lumbalwirbeln, wurde ein etwa 1,5 cm langer Schnitt geführt, die Muskulatur nach Durchtrennung der Fascie stumpf beiseite präpariert und retroperitoneal die Nebenniere entfernt. Die Tiere wurden mit Haferflocken und Zucker gefüttert. Damit der Ionenhaushalt der Ratten nicht gestört werden sollte, wurde physiologische NaCl-Lösung als Flüssigkeit gegeben. 48 Stunden nach der Adrenalektomie ist nach K a r g ²², B a c h m a n n ²³ und C a n a l i s ²⁴ kaum eine Regeneration von Nebennierengewebe zu erwarten.

2. Versuchsreihen

Versuchsreihen 1, 2 und 3. Es wurden pro 100 g Tier 1 Gamma Adrenalin subcutan appliziert.

Versuchszeiten bei Versuchsreihe 1: 0 Min. und 30 Min.

" " " 2: 15 Min. und 45 Min.

" " " 3: 60 Min. und 90 Min.

Versuchsreihe 4. Da die größte Hyaluronidase-Hemmung bei der Versuchsreihe 3 auftrat, wurden bei diesem Versuch (4) adrenalektomierte Ratten verwendet, mit den Versuchszeiten der Versuchsreihe 3, d. h. Versuchszeiten: 60 Min. und 90 Min.

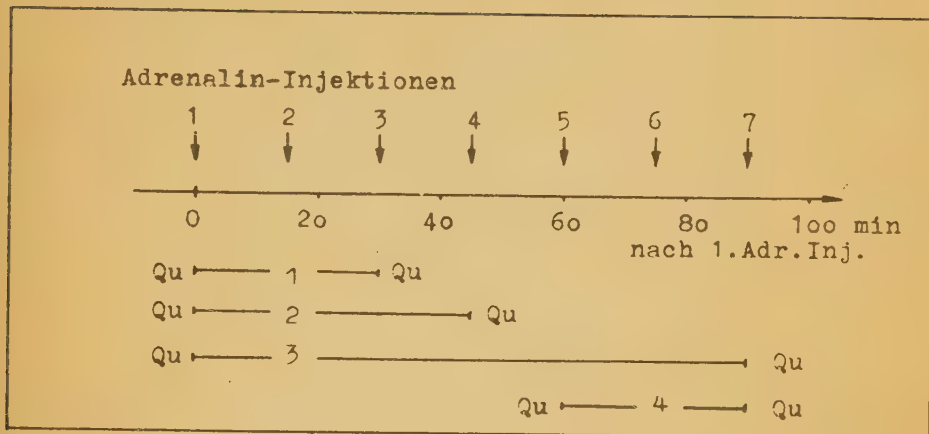


Abbildung 1: Versuchsablauf für die Beobachtung der Hyaluronidaseaktivität bei intakten und adrenalectomierten Ratten.

Die in den einzelnen Versuchsreihen angewandten Lokalisationsschemen finden sich in den Tabellen I und II. Die gefundenen einzelnen Werte sind in den Tabellen III - V (Versuchsreihe 1 - 3) und in der Tabelle VI (Versuchsreihe 4) aufgeführt.

Lateinisches Quadrat für Versuchsreihe 1 und 2

L o k a l i s a t i o n

	1	2	3	4	5	6
Tier Nr.						
1	F ₁	F ₂	FH _v	F _v	FH ₁	FH ₂
2	F ₂	FH _v	F _v	FH ₁	FH ₂	F ₁
3	FH _v	F _v	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂
4	F _v	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂	FH _v
5	FH ₁	FH ₂	F ₁	F ₂	FH _v	F _v
6	FH ₂	F ₁	F ₂	FH _v	F _v	FH ₁

T a b e l l e I

(Versuchsreihe 1: F₁=0 Min F₂=30 Min FH₁=0 Min FH₂=30 Min)

(Versuchsreihe 2: F₁=15Min F₂=45 Min FH₁=15Min FH₂=45 Min)

Lateinisches Quadrat für Versuchsreihe 3 und 4

L o k a l i s a t i o n

	1	2	3	4	5	6
Tier Nr.						
1	F ₆₀	F ₉₀	FH _v	FH ₉₀	F _v	FH ₆₀
2	F ₉₀	FH _v	FH ₉₀	F _v	FH ₆₀	F ₆₀
3	FH _v	FH ₉₀	F _v	FH ₆₀	F ₆₀	F ₉₀
4	FH ₉₀	F _v	FH ₆₀	F ₆₀	F ₉₀	FH _v
5	F _v	FH ₆₀	F ₆₀	F ₉₀	FH _v	FH ₉₀
6	FH ₆₀	F ₆₀	F ₉₀	FH _v	FH ₉₀	F _v

T a b e l l e II

Tier Nr.	F_v in mm ²	F_0 Min in mm ²	F_{30} Min in mm ²	FH_v in mm ²	FH_0 Min in mm ²	FH_{30} Min in mm ²
1	130	111	133	200	255	218
2	136	118	119	233	265	218
3	104	98	126	211	202	225
4	115	117	120	238	214	212
5	128	145	106	279	240	191
6	156	152	136	260	241	207

T a b e l l e III
(Versuchsreihe 1)

Tier Nr.	F_v in mm ²	F_{15} Min in mm ²	F_{45} Min in mm ²	FH_v in mm ²	FH_{15} Min in mm ²	FH_{45} Min in mm ²
1	110	135	120	285	245	197
2	146	135	125	229	247	283
3	140	130	122	279	252	210
4	130	125	130	245	246	205
5	140	248	130	246	208	215
6	135	137	139	233	242	235

T a b e l l e IV
(Versuchsreihe 2)

Tier Nr.	F _v in mm ²	F _{60 Min} in mm ²	F _{90 Min} in mm ²	FH _v in mm ²	FH _{60 Min} in mm ²	FH _{90 Min} in mm ²
1	140	157	120	230	226	178
2	154	147	108	235	223	152
3	144	132	135	225	189	107
4	139	140	130	227	193	188
5	148	125	149	254	200	200
6	141	158	126	259	207	193

T a b e l l e V
(Versuchsreihe 3)

Tier Nr.	F _v in mm ²	F _{60 Min} in mm ²	F _{90 Min} in mm ²	FH _v in mm ²	FH _{60 Min} in mm ²	FH _{90 Min} in mm ²
1	123	160	177	252	238	214
2	160	140	148	228	207	210
3	185	157	171	238	266	243
4	157	154	138	285	259	215
5	136	167	161	244	258	234
6	157	140	124	256	200	178

T a b e l l e VI
(Versuchsreihe 4)

Mathematisch-statistische Methodik

Die vorliegenden Meßreihen werden zunächst durch die statistischen Maßzahlen Mittelwert $\bar{\bar{x}}$ und mittlere quadratische Abweichung (m.q.A.) $s_{\bar{x}}$ beschrieben. Für die Prüfung von Unterschieden sind die Einflüsse versuchsbedingter Variabilitäten zu berücksichtigen. In einer zweifachen Varianzanalyse läßt sich die Gesamtvarianz nach drei Komponenten hin trennen und damit unter Berücksichtigung des Einflusses der Variabilität zwischen den Tieren und der Komponente zwischen den Stufen einer Restvarianz finden, die als methodische Variabilität bezeichnet werden kann. Aus ihrem Verhältnis zur Komponente zwischen den Beobachtungsstufen ist mittels des Quotientests ($F_{\text{emp.}}$) nach Fischer bisher auf tatsächlich bestehende Unterschiede zwischen den Beobachtungen verschiedener Zeiten zu schließen, soweit die zugelassene Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0.05$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung nicht überschritten wird.

Als Ergebnisse der mathematisch statistischen Analyse sind die Freiheitsgrade FG der Varianzkomponente, Summenabstandsquadrate SAQ und Mittlere Abstandsquadrate MAQ, die Varianzquotienten $F_{\text{emp.}}$ zwischen jeweiliger Komponente und Restvarianz, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben, die ein Maß der Sicherheit für die getroffene Entscheidung (Differenz der Mittelwerte $\bar{x}_d = 0$) darstellt.

Die Ausbreitung der Quaddeln in % bezieht sich auf die beobachteten zugehörigen Kontrollwerte (100 %).

Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen

In den folgenden Tabellen (VII - VIII, s. auch Abbildung 2 und 3) sind die Meßergebnisse der experimentellen Untersuchungen durch Mittelwerte $\bar{x}$ und mittlere quadratische Abweichungen (m.q.A.) $s_{\bar{x}}$ beschrieben und die Farbstoffausbreitung bezüglich ihrer Kontrollen in % angegeben.

Ver- suchs- reihe	Anz. d. Beob.	Zeit nach 1.Inj.	<u>F- Quaddeln</u>			<u>FH- Quaddeln</u>		
			Mittel	m.q.A.	Ausbr.	Mittel	m.q.A.	Ausbr.
			$\bar{x}$	$+ s_{\bar{x}}$	Hemmg. $\pm \%$	$\bar{x}$	$+ s_{\bar{x}}$	Hemmg. $\pm \%$

Kontrollwerte K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung unter wiederholter Adrenalin-Injektion intakter Ratten.

1	6	K	128.	7.3		235.	12.3	
	.	0'	123.	8.5	- 4	236.	9.8	0
	.	30'	123.	4.4	- 4	209.	4.9	-11
2	6	K	133.	5.2		253.	9.6	
	.	15'	135.	3.2	+ 2	240.	6.5	- 5
	.	45'	128.	2.8	- 4	224.	12.9	-11
3	6	K	144.	2.3		238.	5.9	
	.	60'	143.	5.4	- 1	206.	6.3	-13
	.	90'	128.	4.6	-11	169.	14.3	-29

T a b e l l e VII

Kontrollwert K und Meßwerte der Farbstoffausbreitung bei adrenalectomierten Ratten.

4	6	K	153.	8.7		250.	8.0	
	.	60'	153.	4.5	0	238.	11.6	- 5
	.	90'	153.	8.3	0	216.	9.2	-13

T a b e l l e VIII

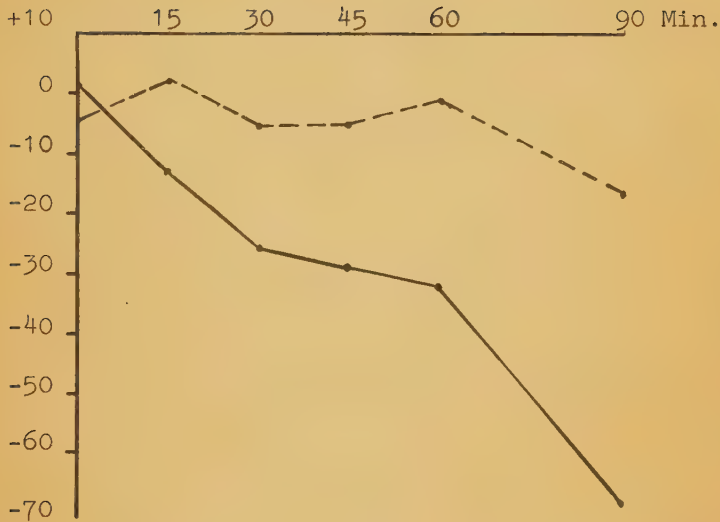


Abbildung 2: Intakte Tiere: Abweichung der Mittelwerte von den Mittelwerten der Vorquaddeln.

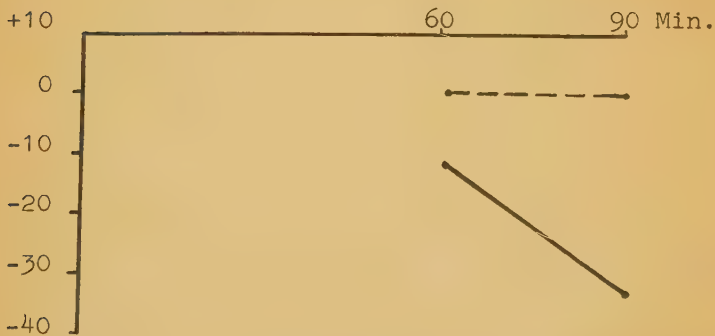


Abbildung 3: Adrenalektomierte Tiere: Abweichung der Mittelwerte von den Mittelwerten der Vorquaddeln.

Mathematisch statistische Analyse und Interpretation der Testergebnisse:

Versuchsreihen 1, 2, 3:

Für verschieden gewählte Beobachtungszeiträume bis zu 90 Min. nach Beginn der Adrenalin-Injektionen geben die Versuchsreihen 1, 2, 3 Aufschluß über die Ausbreitung beider Quaddeltypen.

Die beobachteten Werte für die Hyaluronidaseaktivität weisen im Falle des Farbstoffquaddeltypus über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 90 Min. nach Beginn der Adrenalin-Injektionen nur zufällige Schwankungen um die Ausgangslage auf ($p > 0.05$).

Die beobachteten Werte für den Farbstoffhyaluronidase-Quaddeltypus verlaufen in Abhängigkeit von der Zeit näherungsweise linear; danach ist die Hemmung als zeitabhängige Veränderung der Aktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum weg als konstant zu betrachten, wenngleich die Analyse der Varianzen eine ausgesprochen sichere Hemmung der maximal im Farbstoffausbreitung letztbeobachteten Zeitintervall 60 bis 90 Min. nach erster Adrenalin-Injektion angibt ($p < 0.001$).

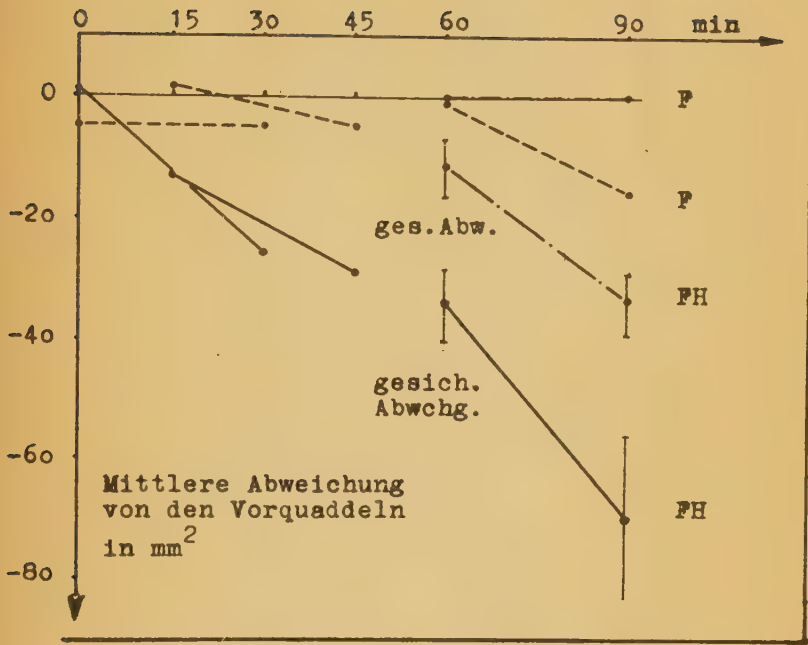


Abbildung 4: Mittlerer Aonahmebereich der Farbstoffausbreitung (Mittelwerte und m.q.A.) gegenüber den Vorquaddeln bei intakten und adrenalectomierten Tieren.

Varianzanalysen

Beobach- tungs- zeiten in Min.	Varianz- komponente	FG	SAQ	MAQ	F _{emp}	P
<u>Farbstoffquaddeln</u>						
	gesamt	17	4432	-	-	-
K- 0'-30'	zw. Tieren	5	2506	501.2	2.74	>0.05
	zw. Stufen	2	90	45.	0.24	>0.05
	Rest	10	1836	183.6	-	-
	gesamt	17	1523	-	-	-
K-15'-45'	zw. Tieren	5	635	127.	1.79	>0.05
	zw. Stufen	2	180	90.	1.27	>0.05
	Rest	10	708	70.8	-	-
	gesamt	17	3015	-	-	-
	zw. Tieren	5	80	16.	0.08	>0.05
	zw. Stufen	2	996	498.	2.57	>0.05
	Rest	10	1939	193.9	-	-

T a b e l l e IX

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

	gesamt	17	10884	-	-	-
K- 0'-30'	zw. Tieren	5	1620	324.	0.50	>0.05
	zw. Stufen	2	2777	1388.5	2.14	>0.05
	Rest	10	6487	648.7	-	-
	gesamt	17	11514	-	-	-
K-15'-45'	zw. Tieren	5	1744	348.8	0.48	>0.05
	zw. Stufen	2	2474	1237.	1.69	>0.05
	Rest	10	7296	729.6	-	-
	gesamt	17	22315	-	-	-
K-60'-90'	zw. Tieren	5	4037	807.4	1.87	>0.05
	zw. Stufen	2	13963	6981.5	16.20	<0.001
	Rest	10	4315	431.5	-	-

T a b e l l e X

Versuchsreihe 4:

Im Beobachtungszeitraum 60 bis 90 Min. nach Beginn der Adrenalin-Injektionen (als angenommener Zeit maximalen Hyaluronidase-Spreadings) auf adrenalektomierte Ratten gesetzte Farbstoffquaddeln breiten sich den beobachteten Werten und ihrer Prüfung zufolge nicht aus. Die Analyse der Varianzen stellt sicher, daß sich die als zufällig erwiesene Schwankung der Meßwerte intakter Tiere vom Werteverlauf adrenalektomierter Tiere im angeführten Beobachtungszeitraum nicht unterscheidet.

Für den Farbstoffhyaluronidase-Quaddeltypus gibt die Analyse der Messung trotz eines unterschiedlichen Verhaltens der Versuchstiere eine gesicherte Hemmung des Spreadings um mittlere 13 % ($p < 0.01$). Der Vergleich mit der Hemmung bei intakten Tieren im gleichen Zeitraum stellt lediglich für adrenalektomierte Tiere um ca. 12 % höhere Absolutwerte, jedoch keinen Unterschied im Grad ihrer Hemmung sicher (p für unterschiedliche Hemmung > 0.05).

Varianzanalysen

Beobach- tungszei- ten in Min.	Varianz- komponente	FG	SAQ	MAQ	F _{emp.}	P
---	------------------------	----	-----	-----	-------------------	---

Farbstoffquaddeln

K-60'-90'	gesamt	17	4949	-	-	-
	zw. Tieren	5	1535	307	0.90	
	zw. Stufen	2	0	0	0.	> 0.05
	Rest	10	3414.	341.4	-	-

Farbstoffhyaluronidasequaddeln

K-60'-90'	gesamt	17	12232	-	-	-
	zw. Tieren	5	4760	952.	3.48	$p < 0.05$
	zw. Stufen	2	4737	2368.5	8.68	$p < 0.01$
	Rest	10	2735	273.5	-	-

Der Farbstoff-Quaddeltypus schwankt bei intakten Tieren unter Einwirkung von Adrenalin nur zufällig um die Ausgangswerte der Vorquaddeln. Eine eigentliche Farbstoffverkleinerung weisen unter gleichen Bedingungen erst Farbstoffhyaluronidasequaddeln auf. Sie verläuft in Abhängigkeit von der Zeit näherungsweise linear und tritt maximal im beobachteten Zeitraum 60 bis 90 Min. nach erster Adrenalin-Injektion mit $p < 0.01$ hochgesichert ein.

Adrenalektomierte Tiere, bei denen die Quaddeln zur nachgewiesenen Zeit maximaler Einschränkung gesetzt wurden, weisen demgegenüber nur für den Farbstoffhyaluronidase-Quaddeltypus eine geringere Hemmung der Farbstoffausbreitung auf.

Diskussion

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß bei viertelstündiger subcutaner Applikation von je 1 Gamma Adrenalin/100 g Ratte eine deutliche Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität im Spreading-Test auftritt, die im Versuchszeitraum von 90 Min. ständig zunimmt und 90 Min. nach Applikation der ersten Adrenalin-Injektion eine Mittelwertsdifferenz von -48 mm^2 erreicht. Dieses Ergebnis bedeutet die geringste Farbstoffausbreitung der Farbstoffhyaluronidase-Quaddel gegenüber dem Leerwert vor Adrenalin-Applikation. Dieser Wert entspricht unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methodik etwa dem Ausmaß der Hyaluronidasehemmung, wie es in anderen Versuchen bei gleicher Dosis und bei intravenöser Verabreichung bereits 15 Min. nach Applikation beobachtet wurde². In unseren Versuchen betrug die Hemmung 15 Min. nach der ersten Adrenalin-Applikation nur -13 mm^2 und 45 Min. nach der ersten Adrenalin-Applikation -29 mm^2 . Damit kann gesagt werden, daß die Hyaluronidase-Hemmung bei subcutaner Applikation einer gleichen Dosis das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung im Bezug auf eine einmalige oder die erste Applikation geringer zu sein als bei intravenöser Applikation scheint. Die Zunahme der Hyaluronidase-Hemmung in unseren Untersuchungen bei wiederholten viertelstündigen Adrenalin-Gaben bei subcutaner Applikation resultiert aus der Wirkung der einzelnen Injektionen und aus der zeitbedingten Nachwirkung der vorangegangenen Injektionen. Dazu kommt der Einfluß etwaiger zusätzlicher Adrenalin-Freisetzungen aus dem Nebennierenmark, wie er eingangs diskutiert wurde. Eine Aufgliederung dieser komplexen Effekte bezüglich der zu den verschiedenen Versuchszeiten in unseren Versuchsreihen gefundenen Werte scheint nicht möglich. Zusammen-

fassend betrachtet läßt sich jedoch feststellen, daß bei intakten Ratten subcutane Adrenalin-Applikationen in viertelstündigen Abständen zu einer Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität führen, wie sie auch in anderen Versuchsanordnungen von V o g e l und Mitarbeitern ²¹ mit geringerer Dosis gefunden wurden. Auch bei adrenaletomierten Tieren konnten wir bei gleicher Versuchsanordnung mit viertelstündiger Adrenalin-Applikation eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität feststellen, die jedoch in den Versuchszeiten 60 Min. und 90 Min. nach der ersten Adrenalin-Injektion wesentlich geringere Hemmwerte aufwies.

Eine entsprechende deutliche Differenz zwischen den Ergebnissen zwischen intakten und adrenaletomierten Ratten wurde von anderen Autoren bei einzeitiger intravenöser Applikation nicht gefunden ^{2, 8}. Möglicherweise zeichnet sich hier bei dem geringeren Effekt der subcutanen Applikation ein ähnliches Verhalten ab, wie es bei den oben erwähnten Adrenalin-Dauerinfusionen bei adrenaletomierten Ratten gefunden wurde. Das bedeutet, daß bei dieser Versuchsanordnung der wiederholten Adrenalin-Applikationen bei adrenaletomierten Ratten die zur Auslösung der Hyaluronidase-Hemmung erforderliche Niveau-Differenz des Katecholblutspiegels nicht hinreichend erzielt wurde. Damit ist die Versuchsanordnung wiederholter Adrenalin-Applikationen zum Nachweis der Hyaluronidase-Hemmung des Adrenalins als nicht geeignet zu betrachten. Die Tatsache, daß bei wiederholten Adrenalin-Gaben bei intakten Tieren dennoch eine maximale Hyaluronidase-Hemmung erreicht wird, mag darauf beruhen, daß durch die Adrenalin-Applikation das Nebennierenmark zu zusätzlicher Katecholamin-Freisetzung angeregt wird. Daß die im Nebennierenmark zur Freisetzung verfügbaren Katecholaminmengen ausreichen, um eine Hyaluronidase-Hemmung deutlich werden zu lassen, wur-

de in früheren Versuchen bereits festgestellt. So nimmt der Katecholamin-Gehalt der Nebennieren, wie bereits erwähnt, nach Gaben hyaluronidasehemmender Substanzen um mehr als 6 Gamma/100 g Ratte ab ^{3, 18, 19}. Auch konnte gezeigt werden, daß Adrenalin-Dauerinfusionen bei intakten Ratten im Gegensatz zu adrenalektomierten Tieren eine Hyaluronidase-Hemmung sichtbar werden lassen ¹⁶. Dieser Effekt ist vermutlich vorwiegend den aus dem Nebennierenmark freigesetzten Katecholaminmengen zuzuschreiben. Somit ist nicht sicher, inwieweit die Hyaluronidase-Hemmung bei wiederholten subcutanen Adrenalin-Injektionen bei intakten Ratten direkte Folge der applizierten Adrenalinmengen oder in erster Linie Effekt der aus dem Nebennierenmark freigesetzten Katecholaminmengen ist.

Zusammenfassung

Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß einzeitige intravenöse Adrenalin-Applikationen bei intakten und adrenaletomierten Ratten im Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Test eine Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität hervorrufen, und eine Adrenalin-Dauerinfusion bei adrenaletomierten Tieren läßt keine Hyaluronidasehemmung in Erscheinung treten. Diese wird erst nach Absetzen der Infusion sichtbar. Die Ursache für dieses Verhalten wurde darin gesehen, daß erst das Absinken eines vorher erhöhten Katecholaminblutspiegels die Hyaluronidasehemmung auslöst. Eine Adrenalin-Dauerinfusion bei intakten Ratten führt vermutlich deshalb zu einer Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität, weil die Adrenalin-Applikation, wie auch durch andere Versuche erhärtet, zusätzliche Adrenalin-Freisetzungen aus dem Nebennierenmark bedingt.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit viertelstündliche subcutane Adrenalin-Applikationen Verhältnisse schaffen, wie sie bei der genannten intravenösen Adrenalin-Dauerinfusion vorliegen. Da mit dieser Versuchsanordnung eine Hyaluronidasehemmung bei intakten Ratten deutlich war, bei adrenaletomierten Tieren jedoch eindeutig geringer ausfiel, erweist sich die subcutane Applikation mit viertelstündlichen Abständen nicht als optimale Versuchsanordnung zum Nachweis einer Hyaluronidase hemmende Wirkung des Adrenalins. Ein solcher Applikationsmodus wurde entsprechenden Untersuchungen von anderer Seite zugrundegelegt.

Literaturverzeichnis

1. Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 892
(1957)
2. Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. Schmidt, D.
Med. Exp. 1, 64 (1959)
3. Mathies, H., Biechele, I. u. Hartmann, M. Ärztl.
Forsch. 14, I/160 (1960)
4. Mathies, H. u. Scholze, H. Arzneimittelforsch. 12,
79 (1962)
5. Mathies, H. Med. Exp. 6, 88 (1962)
6. Mathies, H. u. v. Werther, G. Zschr. angew. Bäder-
Klimahk. 5, 503 (1958)
7. Mathies, H. Med. Mschr. 12, 685 (1958)
8. Mathies, H. Zschr. Rheumaforsch. 18, 205 (1959)
9. Mathies, H. Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
10. Mathies, H. Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
11. Domenjoz, R. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225,
14 (1955)
12. Sayers, G. u. Sayers, M. Endocrinology 40, 256 (1947)
13. Mathies, H. Ärztl. Forsch. 12 I/87 (1958)
14. Mathies, H. Arch. int. pharmacodyn. 123, 333 (1960)
15. Mathies, H. Verh. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 65
Kongr. 1959
16. Mathies, H. u. Schlierf, G. Med. Exp. 2, 334 (1960)
17. Mathies, H. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 64
Kongr. 1958
18. Mathies, H. u. v. Werther, G. Zschr. angew. Bäder-
Klimahk. 5, 582 (1958)
19. Mathies, H. Zschr. Rheumaforsch. 17, 375 (1958)
20. Malorny, G. Dtsch. med. J. 4, 1 (1955)
21. Vogel, G., Uebel, H. u. Marek, M.-L. Zschr. Ges.
exp. Med. 134, 1 (1960)

- 22. Karg, H.: persönliche Mitteilung
- 23. Bachmann, R.: Anatomie d. Menschen VI, 5, 222
(Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg
1954)
- 24. Canalis, P.: zit. Bachmann (23)

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas. Herrn Dr. H. Mathies bin ich für die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung und Gestaltung der Arbeit zu besonderem Dank verbunden. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise vom Laboratorium für medizinische Statistik in Zürich, Herrn Walter Joh. Ziegler, übernommen.

Als drittes von drei Kindern des Dr. med. Menelaos Apostolopoulos und seiner Ehefrau Marika, geborene Leipsanopoulou, wurde ich am 6. Februar 1936 in Mykonos/ Griechenland geboren. 1942 trat ich in die Volksschule ein, besuchte nach dem 6. Schuljahr das Gymnasium in Tinos und absolvierte die 2. Klasse. 1950 wechselte ich dann in das "B'Gymnasium für Knaben" in Athen und schloß dort mit dem Abitur ab. 1955 fuhr ich nach Schweden. Ich lebte in Sigtuna und studierte auf der Hochschule in Stockholm Psychologie mit Soziologie und Pädagogik als Nebenfächer. Ich betätigte mich dort als Schriftsteller. Es erschienen eine Schilderung über Mykonos, eine direkte Übersetzung von Homers Odyssee neben eigenen Novellen, ein Roman und Gedichte. Im Wintersemester 1957/58 begann ich das Medizinstudium an der Universität München und bestand dort im Sommer 1960 die ärztliche Vorprüfung. Meine klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls in München, mit Ausnahme der Famulatur im Akademiska Sjukhuset, Uppsala/Schweden, Berlin, Mykonos und zuletzt in der ophthalmologischen Universitätsklinik München. Im Februar 1964 bestand ich das Staatsexamen in München und seit Juli arbeite ich als Medizinalassistent im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Neuburg a.d. Donau. Später möchte ich mich der chirurgischen Fachdisziplin widmen.



